

10/9/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

002504768

WPI Acc No: 1980-22788C/198013

**Coenzyme-Q prodn. by culturing Pseudomonas microorganism - in presence of**

**isopentenyl acetate, prenol, prenyl acetate, geranyl acetate and/or beta-methyl-crotonic acid**

Patent Assignee: AIDA H (AIDA-I)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 55021756	A	19800216				198013 B
JP 81053358	B	19811218				198203

Priority Applications (No Type Date): JP 7894665 A 19780804

Abstract (Basic): JP 55021756 A

Prodn. of coenzyme Q comprises culturing microorganism of Pseudomonas genus in culture medium contg. substances selected from isopentenyl acetate, prenol, prenyl acetate, geranyl acetate and/or beta-methylcrotonic acid and taking out resultant coenzyme.

The microorganism may be Pseudomonas rubescens IAM-1510 or Pseudomonas fulva IAM-1529, for coenzyme Q8; and Pseudomonas diminuta

IAM-1513 or Pseudomonas denitrificans IAM-12023 for coenzyme Q10.

Coenzyme Q is contained widely in animal plant and microbes and plays important role as constituent component of terminal electron transport system. Coenzyme Q has been found to have excellent pharmacological action and physiological action on various diseases.

Title Terms: COENZYME-Q; PRODUCE; CULTURE; PSEUDOMONAS; MICROORGANISM; PRESENCE; ISO; PENTENYL; ACETATE; PRENOL; PRENYL; ACETATE; GERANYL; ACETATE; BETA; METHYL; CROTONIC; ACID

Derwent Class: B05; D16

International Patent Class (Additional): C12P-007/66; C12R-001/38

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B02C1; D05-C03

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* V800 G100 M531 L951 H541 H542 H721 H711 H722 H723 M240 M232 M233 M331 M333 N130 M510 M520 M540 M720 M414 M902

Chemical Fragment Codes (M2):

\*02\* K0 H5 H7 M282 M210 M211 M215 M216 M231 M232 M240 M270 M311 M315 M316

M320 G100 M531 L951 H541 H542 H721 H711 H722 H723 N130 M510 M520 M540 M720 M414 M902

?

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭55-21756

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>

C 12 P 7/66

// C 12 R 1/38

識別記号

庁内整理番号

6760-4B

④ 公開 昭和55年(1980)2月16日

発明の数 1

審査請求 有

(全 6 頁)

⑭ 補酵素Qの製造方法

三鷹市大沢2-20-32

⑯ 発明者 川田泉

横浜市保土ヶ谷区瀬戸谷町298

—46

⑰ 特 願 昭53-94665

⑱ 出 願 昭53(1978)8月4日

⑲ 発明者 相田浩

⑳ 出 願 人 相田浩

浦和市大字根岸681-2

浦和市大字根岸681-2

㉑ 発明者 内田欣哉

㉒ 代理人 弁理士 久保田藤郎

明 細 書

1. 発明の名称

補酵素Qの製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) シュードモナス属に属し補酵素Qの生産能を有する微生物を、イソペンテニルアセテート、プレノール、プレニルアセテート、グラニルアセテートおよびβ-メチルクロトン酸よりなる群から選ばれた物質を単独でまたは二以上を適当に組合わせて添加した培地に培養して補酵素Qを生成せしめ、これを採取することを特徴とする補酵素Qの製造方法。

(2) 微生物がシュードモナス・ルベツセンス IAM-1510またはシュードモナス・フルバ IAM-1529であり、補酵素Qが補酵素Q<sub>8</sub>である特許請求の範囲第1項記載の製造方法。

(3) 微生物がシュードモナス・オレボランス IAM-1508またはシュードモナス・シユイルキリエンシス IAM-1126であり、補酵素Qが補酵

素Q<sub>9</sub>である特許請求の範囲第1項記載の製造方法。

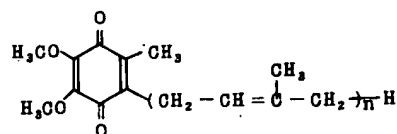
(4) 微生物がシュードモナス・デイミニユータ

IAM-1513またはシュードモナス・デニトリフィカンス IAM-12023であり、補酵素Qが補酵素Q<sub>10</sub>である特許請求の範囲第1項記載の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は補酵素Qの製造方法に関し、さらに詳細にはシュードモナス属に属し補酵素Qの生産能を有する微生物を、イソペンテニルアセテート、プレノール、プレニルアセテート、グラニルアセテートおよびβ-メチルクロトン酸よりなる群から選ばれた物質を単独でまた二以上を適当に組合わせて添加した培地に培養して補酵素Qを生成せしめ、これを採取することよりなる補酵素Qの製造方法に関する。

補酵素Qはその一般式が



で示されるキノン核の6位にイソプレニ側鎖を有する2,3-ジメトキシ-5-メチル-,4-ペンゾキノン群の総称であり、本発明においてはそれぞれ  $n=8$ ,  $n=9$ ,  $n=10$  で示される補酵素  $Q_8$ , 補酵素  $Q_9$ , 補酵素  $Q_{10}$  が対象となる。

補酵素  $Q$  は広く動植物および微生物等に含まれ、末端電子伝達系の構成成分として重要な役割を果たしている。

最近、補酵素  $Q$  が各種疾病に対しすぐれた薬理作用、生理作用を示すことが明らかにされている。その中でとりわけ補酵素  $Q_{10}$  は人間の補酵素  $Q$  が補酵素  $Q_{10}$  であることから医薬品として最も価値が高いものとされているが補酵素  $Q_8$ , 補酵素  $Q_9$  もこれに劣らぬ有用性をもつと考えられる。

補酵素  $Q$  を得る方法としては、動植物組織や微生物菌体からの抽出および有機合成法等が考えられる。これらのうち動植物組織から抽出する方法は大規模に生産することが困難であり、また合成法は収率に関し難点があり、いずれも工業的手段としては不満足な方法である。これに反し、微生

物から採取する方法は収率如何によつては十分経済的に成立し得る可能性がある。

シュードモナス属の微生物で補酵素  $Q_{10}$  を生産するものとしてはシュードモナス・デニトリフィカンス, シュードモナス・ディミニュータ等が知られ、補酵素  $Q_9$  を生産するものとしてはシュードモナス・アエルギノーザ, シュードモナス・シユイルキリエンシス, シュードモナス・オパリス, シュードモナス・リボフラビナ, シュードモナス・プトレファシエンス, シュードモナス・オレポランス等が知られ、また補酵素  $Q_8$  を生産するものとしてはシュードモナス・オーレオファシエンス, シュードモナス・ダクネー, シュードモナス・サツカロフィラ, シュードモナス・プチダ, シュードモナス・ルベツセンス, シュードモナス・テトロレンス, シュードモナス・フラギ, シュードモナス・アザトフォルマンス, シュードモナス・フルバ等が知られている。

本発明者らは、補酵素  $Q$  の生産能を有するシュードモナス属細菌を用いて、その増殖培地に添加

して単位菌体あたりの補酵素  $Q$  の含量を、無添加の場合に比較して著るしく増大させる化合物の検索を行なった。

従来、補酵素  $Q$  の生合成前駆体の中で生育培地に添加した時に、その単位菌体あたりの補酵素  $Q$  の含量を増大させる物質として  $p$ -ヒドロキシ安息香酸や酢酸もしくはその塩等が知られている。補酵素  $Q$  のイソプレニ側鎖部分は細胞内ではジメチルアリルピロリン酸にイソペンテニルピロリン酸が順次縮合をくりかえし、ゲラニルピロリン酸、ファルネシルピロリン酸を経て生合成されることが知られている。しかし、これらの真の前駆体は細胞膜不透過のために、これらを微生物の生育培地に添加し、補酵素  $Q$  の生産を高める試みはこれまでなされていない。

そこで本発明者らは種々の化合物について検討した結果、生育培地にプレノール, イソペンテニルアセテート, プレニルアセテート, ゲラニルアセテート,  $\beta$ -メチルクロトン酸を単独でまたは二以上の物質を適当に組合わせて添加した場合に

これらが補酵素  $Q$  の生産能を有するシュードモナス属の細菌の細胞内に容易に取り込まれ、かつ単位菌体あたりの補酵素  $Q$  の含量を著るしく増大させるという知見を得た。本発明は上記の知見に基づき、さらに研究を重ねた結果完成されたものである。すなわち本発明は、シュードモナス属に属し補酵素  $Q$  の生産能を有する微生物を、プレノール, イソペンテニルアセテート, プレニルアセテート, ゲラニルアセテートおよび  $\beta$ -メチルクロトン酸よりなる群から選ばれた物質を単独でまたは二以上を適当に組合わせて添加した生育培地に培養し、補酵素  $Q$  を生成せしめ、これを採取することを特徴とする補酵素  $Q$  の製造法を提供するのである。

本発明に使用する微生物はシュードモナス属に属し、補酵素  $Q$  を生産する能力をもつものであればよい。特にシュードモナス・ルベツセンス (*Pseudomonas rubescens*) IAM-1510, シュードモナス・フルバ (*Pseudomonas fulva*) IAM-1529, シュードモナス・オレポランス

( *Pseudomonas oleovorans* ) IAM - / 508, シュードモナス・シュイルキリエンシス ( *Pseudomonas schuylikilliensis* ) IAM - / / 26, シュードモナス・デミニュータ ( *Pseudomonas diminuta* ) IAM - / 5 / 3 およびシュードモナス・デニトリフィカンス ( *Pseudomonas denitrificans* ) IAM - / 2023 は補酵素 Q を高収率で生産することができるので好ましい菌株である。

本発明を実施する場合に用いる培地について述べると、炭素源としてはグルコース、糖蜜等の糖質、その他シュードモナス属細菌の生育し得る炭素源であれば任意に使用出来る。窒素源としては硫酸、硝酸等の無機窒素化合物、コーンステープリカー、魚肉エキス、ペプトン、麦芽エキス、酵母エキス等の有機窒素化合物などを適宜使用することが出来る。その他無機塩類としてカリウム塩、ナトリウム塩、マグネシウム塩、リン酸塩、硫酸塩等を適宜用いる。

培養は通常 pH 4 ~ 8, 温度 25 ~ 35 °C で 10 ~ 50 時間通気攪拌培養により行なう。本発明で

補酵素 Q の同定は UV スペクトル, 融点測定, アセトン: 水 ( 95 : 5 ) を展開溶媒とする逆相薄層クロマトグラフィー, NMR およびマススペクトル等により標準品と比較することにより行なつた。

次に本発明を実施例により具体的に説明するが本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 実施例 /

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.15%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%, グルコース 1%, ペプトン 1%, 酵母エキス 0.2% を含む培地 ( pH 7.0 ) 150 を 300 容のジャーフアーマンターに入れ、加圧滅菌後、10 ml のエタノールに溶解したプレノール 645 ㎎を加えた。一方、上記組成の培地 500 ml に予め 24 時間培養しておいたシュードモナス・ルベツセンス ( *Pseudomonas rubescens* ) IAM - / 5 / 0 を上記培地に接種し、攪拌数 300 回転/分、通気量 150 / 分、温度 27 °C の条件で 48 時間通気攪拌培養を行つた。なお、pH の変動に対してはアンモニアまたは塩酸の添加により pH 7.0

特開 昭55-21756 (3)

使用するプレノール, イソペンチルアセテート, プレニルアセテート, グラニルアセテートおよび  $\beta$ -メチルクロトン酸の添加方法, 時期等は任意であり、たとえば培養初め、あるいは培養途中で一度に添加するか、または醗酵状態に応じて分割して加える。これらの物質は最終濃度として通常  $1 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-5}$  モル/ℓ、好適には  $5 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-4}$  モル/ℓ となるように添加する。

またこれらの物質を適宜任意に組合わせて使用することも出来る。

培養終了後、菌体から補酵素 Q を抽出単離するには、たとえば培養液を遠心分離して得られた湿菌体をアセトン等の親水性溶媒で抽出し、得られたアセトン抽出物から補酵素 Q を含むフラクションを石油エーテル等の溶媒に転溶し、アルミナカラム等を用いて分別精製を行なつて単離することが出来る。なお、用途によつては補酵素 Q を単離しないで、菌体を含んだまま使用することも可能である。

に保つた。

培養終了後、培養液を遠心分離して湿菌体 730 g (乾燥菌体として 135 g) を得た。

得られた湿菌体にアセトン 2.5 ℓ を加え攪拌抽出を行つた後、遠心分離により菌体を除いた。この操作を 2 回くり返して得られたアセトン抽出物を合し、減圧濃縮を行ないアセトンを留去した。しかる後に残液を 1 ℓ の石油エーテルにて抽出し石油エーテル層を集めた。これを水洗後、芒硝で乾燥し濃縮した。この残液を少量の石油エーテルに溶解し、アルミナカラムを用いて石油エーテルとエチルエーテルの混合物で溶出し、補酵素 Q<sub>8</sub> を含む画分を採取した。

この溶出液より溶媒を留去し、残渣を少量のエタノールに溶解して冷所に放置し、補酵素 Q<sub>8</sub> の粗結品を得た。

この粗結品をエタノールから再結品を 3 回くり返し、補酵素 Q<sub>8</sub> の結品 140 ㎎を得た。

一方、プレノールを添加しない上記培地 150 ℓ に前記と同様の培養を行ない、かつ前記と同様の

方法により湿菌 725g (乾燥菌体として 130g) を得た。得られた湿菌体から前記方法と同一の方法により、補酵素  $Q_8$  の結晶 95mg を得た。

以上の結果に基づき補酵素  $Q_8$  の生成、蓄積におよぼすプレノールの効果を比較すると、培地にプレノールを添加したことにより補酵素  $Q_8$  は培養液 1ℓ 当たり約 47% 増加し、乾燥菌体 1g 当たりでは約 42% 増加した。したがって補酵素  $Q_8$  の生産におけるプレノールの添加効果が明確に認められた。

#### 実施例 2

シュードモナス・フルバ (*Pseudomonas fulva*) IAM - 1529 を実施例 1 と同一の培養法により、 $\beta$ -メチルクロトン酸 750mg を添加して培養し、湿菌体 740g (乾燥菌体として 148g) を得、これを処理して補酵素  $Q_8$  の結晶 118mg を得た。

以上の結果に基づき補酵素  $Q_8$  の生成、蓄積におよぼす  $\beta$ -メチルクロトン酸の効果を比較すると、培地に  $\beta$ -メチルクロトン酸を添加したことにより補酵素  $Q_8$  は培養液 1ℓ 当たり約 27% 増加し、また乾燥菌体 1g 当たり約 30% 増加した。

1.47g を培地に添加して培養し、湿菌体 730g (乾燥菌体として 133g) を得、これを処理して補酵素  $Q_9$  の結晶 195mg を得た。

一方、同一菌株についてグラニルアセテート無添加の培養を行ない湿菌体 755g (乾燥菌体として 137g) を得、これを処理して補酵素  $Q_9$  の結晶 160mg を得た。

以上の結果に基づき補酵素  $Q_9$  の生成、蓄積におよぼすグラニルアセテートの効果を比較すると、培地にグラニルアセテートを添加したことにより補酵素  $Q_9$  は培養液 1ℓ 当たり約 22% 増加し、乾燥菌体 1g 当たり約 26% 増加した。

#### 実施例 5

シュードモナス・デニトリフィカンス (*Pseudomonas denitrificans*) IAM - 12023 を実施例 1 と同一の培養法により、イソペンテニルアセテート 960mg およびグラニルアセテート 1.47g を培地に添加して培養し、湿菌体 680g (乾燥菌体として 124g) を得、これを処理して補酵素  $Q_{10}$  の結晶 130mg を得た。

#### 実施例 3

シュードモナス・オレボランス (*Pseudomonas olearans*) IAM - 1508 を実施例 1 と同一の培養法により、プレニルアセテート 960mg を添加して培養し、湿菌体 705g (乾燥菌体として 140g) を得、これを処理して補酵素  $Q_9$  の結晶 192mg を得た。

一方、同一菌株についてプレニルアセテート無添加の培養を行ない湿菌体 710g (乾燥菌体として 142g) を得、これを処理して補酵素  $Q_9$  の結晶 140mg を得た。

以上の結果に基づき補酵素  $Q_9$  の生成、蓄積におよぼすプレニルアセテートの効果を比較すると、培地にプレニルアセテートを添加したことにより補酵素  $Q_9$  は培養液 1ℓ 当たり約 37% 増加し、乾燥菌体 1g 当たり約 38% 増加した。

#### 実施例 4

シュードモナス・シュイルキリエンシス (*Pseudomonas schuylkilliensis*) IAM - 1126 を実施例 1 と同一の培養法により、グラニルアセテート

一方、同一菌株についてイソペンテニルアセテートおよびグラニルアセテート無添加の培養を行ない湿菌体 700g (乾燥菌体として 127g) を得、これを処理して補酵素  $Q_{10}$  の結晶 100mg を得た。

以上の結果に基づき補酵素  $Q_{10}$  の生成、蓄積におよぼすイソペンテニルアセテートおよびグラニルアセテートの効果を比較すると、培地にイソペンテニルアセテートおよびグラニルアセテートを添加したことにより補酵素  $Q_{10}$  は培養液 1ℓ 当たり約 30% 増加し、また乾燥菌体 1g 当たり約 33% 増加した。

#### 実施例 6

実施例 1 の培地組成のうちグルコースを酢酸ソーダに代え、プレノール 645mg の代わりにイソペンテニルアセテート 960mg およびプレニルアセテート 960mg を用いたこと以外は実施例 1 と同様の方法により、シュードモナス・ディミニュータ (*Pseudomonas diminuta*) IAM - 1513 を培養し、湿菌体 695g (乾燥菌体として 126

g)を得、これを処理して補酵素 $Q_{10}$ の結晶/0.5gを得た。

一方、同一菌株についてイソペンテニルアセテートおよびプレニルアセテート無添加の培養を行ない湿菌体700g(乾燥菌体として127g)を得、これを処理して補酵素 $Q_{10}$ の結晶73gを得た。

以上の結果に基づき補酵素 $Q_{10}$ の生成、蓄積におよびイソペンテニルアセテートおよびプレニルアセテートの効果を比較すると、培地にイソペンテニルアセテートおよびプレニルアセテートを添加したことにより補酵素 $Q_{10}$ は培養液/1g当り約44%増加し、また乾燥菌体/1g当り約43%増加した。

特許出願人 相 田 浩  
代 理 人 弁理士 久保田 藤 郎



特開 昭55-21756 (5)  
手 続 補 正 書 (自 発)

昭和55年11月50日

特許庁長官 熊谷 善二 殿

1 事件の表示

特願 昭 5 3 - 9 4 6 6 5

2 発明の名称

補酵素 $Q$ の製造方法

3 補正をする者

事件との関係 特許出願人

相 田 浩



4 代 理 人

〒103  
東京都中央区日本橋本町1丁目5番地

共同ビル(新仲通り)6階

(7407) 弁理士 久保田 藤 郎

5 補正の対象

明細書の特許請求の範囲の欄および発明の詳細な説明の欄

6 補正の内容

I 特許請求の範囲を別紙の如く訂正する。

II 明細書を以下の如く訂正する。

(1) 明細書第4頁4~5行目の「シュードモナス・デニトリフィカンス。」を削除する。

(2) 同第4頁6行目の「補酵素 $Q_0$ を生産するものとしては」と「シュードモナス・アエルギノサ」との間に次の文を加入する。

「シュードモナス・デニトリフィカンス、シュードモナス・ブチダ、シュードモナス・フルバ。」

(3) 同第4頁下から7行目の「シュードモナス・ブチダ。」を削除する。

(4) 同第4頁下から4~5行目の「、シュードモナス・フルバ」を削除する。

(5) 同第1頁下から6行目、下から5行目および下から2行目の「補酵素 $Q_0$ 」を「補酵素 $Q_1$ 」に訂正する。

(6) 同第1頁下から2~1行目の「補酵素 $Q_0$ 」を「補酵素 $Q_1$ 」に訂正する。

(7) 同第14頁4行目、6行目および10行目の「補酵素 $Q_0$ 」を「補酵素 $Q_1$ 」に訂正する。

(以 上)

特許請求の範囲

IAM - 1513 であり、補酵素 Q が補酵素 Q<sub>10</sub> である特許請求の範囲第 1 項記載の製造方法。

(1) シュードモナス属に属し補酵素 Q の生産能を有する微生物を、イソペンテニルアセテート、プレノール、プレニルアセテート、グラニルアセテートおよび  $\beta$ -メチルクロトン酸よりなる群から選ばれた物質を単独でまたは二以上を適当に組合わせて添加した培地に培養して補酵素 Q を生成せしめ、これを採取することを特徴とする補酵素 Q の製造方法。

(2) 微生物がシュードモナス・ルベツセンス IAM - 1510 であり、補酵素 Q が補酵素 Q<sub>10</sub> である特許請求の範囲第 1 項記載の製造方法。

(3) 微生物がシュードモナス・オレガランス IAM - 1508、シュードモナス・シユイルキリエンス IAM - 1126、シュードモナス・フルバ IAM - 1529 およびシュードモナス・デニトリフィカンス IAM - 12025 のうちのいずれかであり、補酵素 Q が補酵素 Q<sub>10</sub> である特許請求の範囲第 1 項記載の製造方法。

(4) 微生物がシュードモナス・デイミニュータ